论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0506-04

CT灌注成像对大鼠急性脑缺血及再灌注模型的评价

马秀华,吕富荣,吕发金,肖智博,黄铀新,李新友,杨 柳,潘 静 (重庆医科大学附属第一医院放射科,重庆 400016)

摘 要:目的 在活体状态下应用CT灌注成像(CT perfusion imaging,CTPI)技术,评价大鼠急性脑缺血及再灌注模型的可靠性及准确性。**方法** 用改良线栓法制作大鼠急性脑缺血及再灌注模型,分别行CTPI检查、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色及HE染色。**结果** ①每组CTPI各时间点脑血流量(cerebral blood flow, CBF)图核心区与脑血容量(cerebral blood volume, CBV)图低灌注区体积比较无统计学差异($P>0.05$),两者所示体积与TTC染色梗死区体积比较无统计学差异($P>0.05$),与平均通过时间(mean transit time, MTT)图缺血区体积比较有统计学差异($P<0.05$)。MTT缺血区体积与TTC染色梗死区体积比较有统计学差异($P<0.05$)。② CTPI各参数图与TTC染色梗死体积间均呈正相关关系,其中CBV相关性最好($r=0.74$)。③梗死区CBF、CBV较对侧均明显减低,MTT延长;缺血半暗带区(Ischemic penumbra, IP)CBF较对侧明显减低,CBV较对侧正常或升高,MTT轻度延长;周围相对正常区CBF、CBV及MTT较对侧未见明显改变。④取梗死区脑组织做HE染色,结果显示以神经细胞死亡表现为主;取IP区脑组织做HE染色,显示以神经细胞变性损伤为主。**结论** CTPI可在活体状态下快速、准确、无创地评价脑缺血再灌注动物模型的脑部血流动力学改变,显示脑梗死区及缺血半暗带区的部位、大小、程度,对超急性期脑梗死治疗及复查具有较强的临床应用价值。

关键词: CT灌注成像;急性脑缺血;脑部血流动力学;半暗带;大鼠

中图法分类号: R-332;R743.31;R816.1 **文献标识码:** A

Evaluating rat model of acute cerebral ischemia-reperfusion by computed tomography perfusion imaging

MA Xiu-hua, LU Fu-rong, LU Fa-jin, XIAO Zhi-bo, HUANG You-xin, LI Xin-you, YANG Liu, PAN Jing (Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the reliability and accuracy of rat model of acute cerebral ischemia-reperfusion in living condition by using CT perfusion imaging (CTPI) technology. **Methods** A stable and reversible acute cerebral ischemia-reperfusion model with unilateral middle cerebral occlusion was established in Wistar rats and evaluated by CTPI, TTC staining and HE staining. There were 2 groups: ischemia group and ischemia + reperfusion group. **Results** ①Cerebral blood flow (CBF) core areas and cerebral blood volume (CBV) of low volume infusion areas on CTPI showed no significant difference at various time points and between the 2 groups ($P>0.05$), and the results obtained from CTPI were concordant with those from TTC staining for infarction zone ($P>0.05$), but significantly different with the ischemic volume of average transit time (MTT) ($P<0.05$). There were significant differences between MTT ischemic volume and infarction zone volume by TTC staining ($P<0.05$). ②There was correlation between CTPI parameters and infarction volume by TTC staining, and CBV relevance was the best ($r=0.74$). ③CBF and CBV in infarction zone were significantly lower than those in contralateral control zone, and MTT extended; CBF in ischemic penumbra (IP) zone was significantly lower than that in contralateral control zone, while CBV was normal or higher, and MTT extended slightly; CBF, CBV and MTT in relatively normal zone had no obvious changes than these on contralateral sides. ④The brain tissue with the matched decrease in CBF and CBV showed the performance-based nerve cell death in HE staining, and the brain tissue with CBF decreased and CBV normal showed the performance-based

基金项目: 重庆市自然科学基金(2007BB5292);重庆医科大学创新基金(CX200501)

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5292) and the Innovation Funds of Chongqing Medical University (CX200501)

作者简介: 马秀华,男,河南省信阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事头颅CT灌注及影像诊断方面的研究。电话:(023)89012655,E-mail: mxh1102008@sina.com

通信作者: 吕富荣,E-mail: lfr918@sina.com

收稿日期: 2008-09-05;**修回日期:** 2008-10-27

nerve cell degeneration. **Conclusion** CTPI as a rapid, accurate, non-invasive method can evaluate the brain homodynamics of cerebral ischemia-reperfusion animal model in living state, and can display the site, size, extent of ischemic region during cerebral infarction, and has important clinical value for the ultra-acute cerebral infarction in treatment and review.

Key words: CT perfusion imaging; acute cerebral ischemia; brain hemodynamics; ischemic penumbra; rats

急性脑缺血是临床的常见病、多发病,其致残率和死亡率较高,微栓塞是其重要的发病机制之一[1]。临床上 85% 的脑缺血是由大脑中动脉栓塞引起的[2]。近年来随着对急性脑缺血治疗的深入研究,急性脑缺血再灌注模型在动物实验中的应用也越来越广,但是对模型制作成功与否,脑缺血的部位、范围、程度及再灌注后缺血区的血流恢复情况等问题缺乏比较理想的评价方法。本研究通过应用 CT 灌注成像(CT perfusion imaging, CTPI)技术,以期实现在活体状态下早期、动态、精确监测评价大鼠急性脑缺血再灌注模型,为急性脑缺血的研究提供一种有效的检测方法。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

选用 48 只健康雌性成年 Wistar 大鼠(重庆医科大学实验动物中心),体质量 220 ~ 250 g,术后采用单纯随机抽样法分为缺血组和缺血再灌注组,缺血组设缺血后 1、2、3、4、6、8 h 6 个时间点(每个时间点 4 只大鼠);缺血再灌注组于上述缺血时间点后分别再灌注 12 h(每个时间点 4 只),2 组均行神经功能缺损评分、CT 灌注扫描及组织病理学检查。

1.2　栓线制作

将直径 0.236 mm 的尼龙线剪成 4.5 cm 长的线段,头端约 0.5 cm 蘸少许硅胶处理成直径约 0.28 mm 后,悬挂于通风处 24 h 以上。用标记笔在距头端(1.8 ±0.2)cm 处标记以控制进线深度,酒精消毒肝素处理后备用。

1.3　动物模型制备

参照 Longa 等[3]改良方法,用线栓法制作大鼠脑缺血再灌注模型,翼腭动脉分离而不结扎,减少了颈内动脉发生血栓的机会及手术时间。

1.4　神经功能缺损评分

手术后待动物清醒或经不同的时间点再灌注后分别观察大鼠的行为表现,进行神经功能缺损评分。参考 Longa 等[3]确立的 5 级评分方法行神经检查等级评分,评价大鼠神经损伤状况。

1.5　CT 灌注扫描及图像处理

采用 GE LightSpeed64 排 CT 扫描机。扫描参数:管电压 80 kV,管电流 100 mA,矩阵 512 ×512,FOV 9.8 cm。大鼠麻醉后俯卧位固定,将 24 G 静脉留置针从尾静脉穿刺固定后与高压注射器连接。自脑组织前极以层厚 2.5 mm 进行连续冠状位动态灌注扫描,采用电影(cine)采集,扫描范围 40 mm/s,采集 16 幅图像,连续扫描 40 s,共动态采集 640 幅图像。灌注扫描启动同时注射非离子型造影剂优维显(370 mg/ml)2 ml,注射流率 0.2 ml/s。

灌注扫描图像传入 ADW4.2 工作站的 Brain Stroke 软件处理,获得双侧不同层面脑血流量(cerebral blood flow, CBF)、脑血容量(cerebral blood volume, CBV)、平均通过时间(mean transit time, MTT)图。分别在上述功能图像上病灶部位选取双侧对称性感兴趣区(region of interest, ROI),记录每个 ROI 的 CBF、CBV 和 MTT。将 CT 灌注参数图像结果与 TTC 染色结果对比,把 ROI 为 3 个区域:梗死中心区,TTC 染色呈白色;IP 区,TTC 染色呈粉红色;相对正常区,TTC 染色呈红色。利用面积测量工具测量 CVB 梗死中心区、CBV 低灌注区及 MTT 缺血区不同层面病灶区的面积,乘以层厚,再各层累加即得病灶在上述 3 个参数图像上的体积,与 TTC 染色梗死体积结果相比较。

1.6　组织病理学检查

CT 检查结束后,大鼠被快速断头取脑,于距额极 2 mm 处向后连续切取层厚 1.5 ~ 2 mm 的冠状切片 5 ~ 6 张,置于 2% 的 TTC 磷酸缓冲溶液中,避光恒温 37 ℃染色 30 min,用数码相机照相,图片输入计算机病理图像分析系统,测各层梗死面积,计算梗死体积。TTC 染色照相后的切片,乙醇脱水脱色,HE 染色。

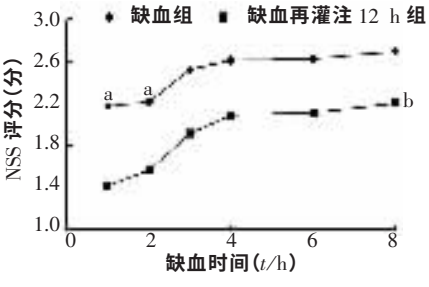
1.7　统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和线性相关分析。

2　结果

2.1　造模后大鼠神经功能缺损的变化情况

大鼠苏醒后均有神经功能缺损症状,评分为 1 ~ 4 分,缺血 1 h 后评分差异无统计学意义($P > 0.05$)。组间神经缺损症状评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。每组内缺血 3、4、6、8 h 神经缺损症状评分变化不明显($P > 0.05$),与缺血 1、2 h 比较评分变化明显($P < 0.05$),缺血 1、2 h 间比较差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。



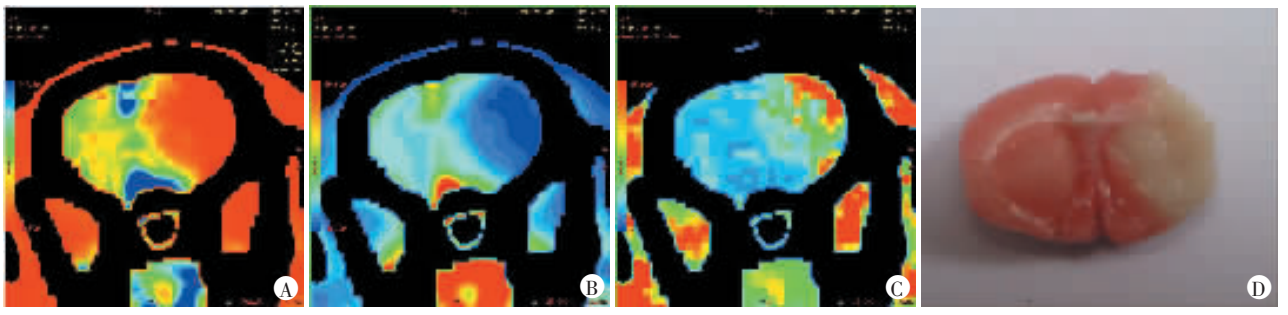
a:$P < 0.05$,与缺血 3、4、6、8 h 比较;b:$P < 0.05$,与缺血组比较

图 1　缺血组和缺血再灌注 12 h 组不同时间点 NSS 评分比较

表 1 缺血组及缺血再灌注组 CTPI 各参数与 TTC 染色所示梗死体积比较(mm^3, $\bar{x} \pm s$)

缺血时间	缺血组				缺血再灌注 12 h 组			
	TTC	CBV	CBF	MTT	TTC	CBV	CBF	MTT
1 h	81.75 ± 44.01^{c}	89.23 ± 32.56^{c}	101.23 ± 45.25^{c}	117.21 ± 42.36^{ac}	31.75 ± 9.35^{bc}	34.52 ± 11.21^{bc}	41.25 ± 21.14^{bc}	49.54 ± 35.28^{abc}
2 h	87.54 ± 52.65^{c}	94.57 ± 25.68^{c}	114.82 ± 36.87^{c}	134.36 ± 45.25^{ac}	39.24 ± 8.96^{bc}	42.36 ± 25.21^{bc}	47.52 ± 31.57^{bc}	54.21 ± 35.25^{abc}
3 h	122.37 ± 29.36	143.56 ± 36.57	153.58 ± 63.14	178.52 ± 35.18^{a}	101.25 ± 24.75^{b}	115.65 ± 32.29^{b}	134.53 ± 54.21^{b}	156.36 ± 26.85^{ab}
4 h	137.47 ± 34.54	157.56 ± 63.13	175.54 ± 36.24	198.35 ± 52.23^{a}	112.63 ± 63.25^{b}	135.65 ± 35.63^{b}	152.43 ± 37.85^{b}	182.12 ± 42.19^{ab}
6 h	142.56 ± 52.47	169.53 ± 35.89	196.32 ± 65.41	214.63 ± 39.85^{a}	129.36 ± 36.53^{b}	145.63 ± 63.52^{b}	178.69 ± 65.14^{b}	213.25 ± 39.85^{ab}
8 h	156.98 ± 43.58	168.32 ± 63.21	189.65 ± 39.54	206.38 ± 52.13^{a}	152.63 ± 63.21^{b}	161.21 ± 32.36^{b}	179.89 ± 36.85^{b}	190.58 ± 42.19^{ab}

a:$P<0.05$,与本组 TTC、CBF 及 CBV 比较;b:$P<0.05$,与缺血组比较;c:$P<0.05$,与本组缺血 3、4、6、8 h 比较



A:CBF;B:CBV;C:MTT;D:TTC 染色

图 2 CTPI 各参数及 TTC 染色所示梗死缺血面积

2.2 梗死体积的变化及其相关性

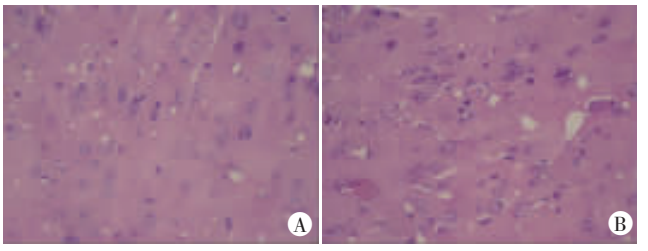
每组动物经 TTC 染色对侧未见梗死灶,缺血侧脑梗死体积随时间延长有增大的趋势。其中缺血 1、2 h 梗死体积与缺血 3、4、6、8 h 比较有统计学差异($P<0.05$);缺血 1、2 h 之间比较无统计学差异($P>0.05$);缺血 3、4、6、8 h 之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。CTPI 每组各时间点 CBF 核心区及 CBV 低灌注区体积比较无统计学差异($P>0.05$),两者所示体积与 TTC 染色梗死区体积比较差异无统计学意义($P>0.05$),与 MTT 缺血区体积比较差异有统计学意义($P<0.05$,表 1、图 2)。TTC 染色梗死区体积与 MTT 缺血区体积比较差异有统计学意义($P<0.05$)。CTP 各参数图与 TTC 染色间梗死体积均呈显著正相关关系,其中 CBV 相关性最高($r=0.74$,$P=0.001$),其次是 CBF($r=0.52$,$P=0.009$),MTT 相关性最低($r=0.41$,$P=0.043$)。

2.3 患侧不同区域 CBF、CBV 及 MTT 的变化情况

梗死中心区 CBF、CBV 值较对侧均明显减低,MTT 较对侧明显延长($P<0.05$);IP 区位于梗死区边缘与正常组织交界处,CBF 值较对侧明显减低($P<0.05$),CBV 呈阶梯状改变,较对侧正常或升高,MTT 轻度延长,差异无统计学意义($P>0.05$);周围相对正常区 CBF、CBV 值及 MTT 较对侧未见明显改变($P>0.05$)。梗死中心区与 IP 区 CBF、CBV 值差异有统计学意义($P<0.05$),MTT 值差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 脑组织缺血梗死区病理情况

由于缺血时间不同,脑组织在 CTPI 及 HE 染色表现各异。缺血组缺血 1、2、3 h,缺血边缘 IP 区脑组织 CBF 减低,CBV 正常、减低或升高,MTT 延长;HE 染色光镜:血管间隙增宽,神经元数量减少,神经细胞水肿,并可见部分神经核固缩,缺血再灌注组 CBF 减低或正常,CBV 正常或升高,HE 染色较缺血组细胞肿胀稍加重。缺血 4、6、8 h 每组缺血中心区 CBF、CBV 均降低,MTT 延长;HE 染色光镜示:神经元间隙显著增宽,神经核固缩,神经细胞水肿明显,神经元细胞核畸变固缩明显,神经终末大部呈空泡状,细胞器消失(图 3)。



A:缺血组;B:缺血再灌注 12 h 组

图 3 缺血 6 h 后皮质缺血区脑组织病理学观察 (HE×400)

3 讨论

大鼠急性脑缺血性模型的制作有开颅机械闭塞法、线栓法、微栓子栓塞法等多种方法。线栓法建立大鼠脑缺血再灌注模型具有不开颅、损伤小、操作简单、缺血区部位较恒定、可准确控制缺血和再灌注时间等优点,便于研究再灌注损害和治疗时间窗的选择,是目前国内外流行的模型制作方法。本研究栓线术前经肝素处理,应用改良方法不结扎翼腭动脉,减少了血栓形成的机会和手术时间,栓塞及再灌注效果均良好。

本研究使用的 64 排螺旋 CT 克服了单层及多层螺旋 CT 灌注扫描范围局限的缺点,扫描速度更快,时间和空间分辨率更高,后处理软件也更丰富精确。不

同时间点的 CTPI 参数图可以动态的反映超急性期脑缺血的血流变化情况,同时 CTPI 还能很好的显示脑缺血的体积:CBF 与 CBV 图像测量缺血体积差异无显著性, 而 MTT 图像缺血体积显示较大,表明 MTT 显示缺血灶比其他参数图更敏感,这一结果与 Nabavi 等[4]结果一致。CBF 及 CBV 参数图像上缺血体积和 TTC 染色结果比较差异无显著性,MTT 缺血体积与 TTC 染色结果差异有显著性,但 3 者与 TTC 染色梗死体积均呈正相关性,其中 CBV 与之相关性更好,MTT 及 CBF 高估梗死体积,这与缺血早期 MTT 及 CBF 对缺血的敏感性有关。

IP 是急性脑缺血临床治疗的关键及目标,也是动物实验研究的重点和焦点。由于 CTPI 简单易行、耗时短不受时间限制,目前已成为诊断和评价 IP 的最重要的方法,尤其是动物实验,在观察 IP 动态演变中广泛应用。本实验 CTPI 显示半暗带 CBF 均减低,CBV 正常或升高,且大多位于大脑中动脉远端血管供血的弧形皮质区,可能是脑血管远端扩张,通过自动调节,增加 MTT 及 CBV,供应最大耗氧量,以维持脑的氧代谢。随着缺血时间的推移,CBF 的进一步减低,IP 逐渐演变为梗死,所以治疗时间窗对于急性脑缺血的治疗尤其重要。Eastwood 等[5]研究表明,急性脑缺血病灶侧 CBF、CBV 和 MTT 与对侧有显著差异,发生梗死的阈值为 CBF 0 ~ 10 ml/(100 g/min)、CBV 0 ~ 1.5 ml/100 g和 MTT > 6 s。Klotz 等[6]研究认为测量两侧 CBF 比值即 rCBF 可以区分可逆性和不可逆性损伤:rCBF < 0.20 时脑组织已发生不可逆性损伤,rCBF 为 0.20 ~ 0.35,提示可逆性损伤。本实验每组缺血 1、2 h 梗死体积与缺血 3、4、6、8 h 梗死体积差异有显著性,说明随着缺血时间的延长,半暗带逐渐向梗死演变;2 组间梗死体积的差异有显著性,说明缺血只要及时再通,半暗带是可以挽救的。

研究表明,CTPI 对于脑缺血有较高的敏感性和特异性[7]。Nabavi 等[8]认为 TTP、CBF、CBV 诊断脑缺血的敏感性分别为 72.6% 、64% 、58.9% ;Murphy 等[7]认为 CBF × CBV 联合诊断脑缺血的敏感性为 90.6% ,特异性为 93.3% 。本研究所有参与统计的模型,梗死区均显示 CBF、CBV 降低,MTT 延长,半暗带区 CBF 降低,MTT 延长,CBV 无明显变化或轻度上升,以上结果与相关研究及 HE 染色结果较一致。

目前,对脑缺血再灌注模型的评价方法主要有神经功能缺损症状评分、激光多普勒测量脑血流的改变、MRI、TTC 染色及 HE 染色。前两者主观性较强,缺乏有效的量化标准,后两者无法实现活体状态下评价,且 MRI 耗时长。作为功能性成像的 CTPI 技术,虽然应用时间还比较短,但因其具有高空间分辨率、高敏感性、高精确性及可重复性等优点而后来居上。本研究表明,在急性脑缺血中,CTPI 可以准确反映模型缺血及再灌注的情况,无创性的评价模型的脑血流动力学改变,显示梗死及缺血的部位、大小、程度,不失为评价脑缺血再灌注模型的一种更有效快捷、实用直观的方法;更重要的是,其检查速度很快(数分钟内可以完成平扫、灌注扫描及图像处理),大大缩短了临床治疗的时间窗,为临床治疗及复查提供了强有力的依据,具有很广阔的临床应用价值。当然,CTPI 还存在一些尚待解决的问题,如梗死体积的测量存在一定的主观因素、X 线辐射剂量、动物对造影剂的耐受性、麻醉状态下麻醉剂对脑的氧代谢及血流的影响等问题,这些都有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Wang X, Lam W W, Fan Y H, *et al*. Topographic patterns of small subcortical infarcts associated with MCA stenosis: a diffusion-weighted MRI study [J]. J Neuroimaging, 2006, 16(3): 266 - 271.

[2] Smith W S, Sung G, Starkman S, *et al*. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke. results of the MERCI trial[J]. Stroke, 2005, 36(7): 1432 - 1438.

[3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.

[4] Nabavi D G, Cenic A, Henderson S, *et al*. Perfusion mapping using computed tomography allows accurate prediction of cerebral infarction in experimental brain ischemia[J]. Stroke, 2001, 32(1): 175 - 183.

[5] Eastwood J D, Lev M H, Azhari T, *et al*. CT perfusion scanning with deconvolution analysis: pilot study in patients with acute middle cerebral artery stroke[J]. Radiology, 2002, 222(1): 227 - 236.

[6] Klotz E, Konig M. Perfusion measurements of the brain: using dynamic CT for the quantitative assessment of cerebral ischemia in acute stroke[J]. Eur J Radial, 1999, 30(1): 170 - 184.

[7] Murphy B D, Chen X, Lee T Y. Serial changes in CT cerebral blood volume and flow after 4 hours of middle cerebral occlusion in an animal model of embolic ischemia[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2007, 28(4): 743 - 749.

[8] Nabavi D G, Dittrich R, Kloska S P, *et al*. Window narrowing: a new method for standardized assessment of the tissue at risk-maximum of infarction in CT based brain perfusion maps[J]. Neurol Res, 2007, 29(3): 296 - 303.

(编辑　张　维)